

POLYMORPHISME DE L'ADÉNOSINE DÉAMINASE (ADA) DANS L'ESPÈCE BOVINE (1)

M. ANSAY et R. HANSET

avec la collaboration technique de Jacqueline ROUPAIN et de Viviane BALDEWIJNS-ROUMA

*Chaire de Génétique,
Faculté de Médecine vétérinaire (Cureghem-Bruxelles),
Université de Liège,
rue des Vétérinaires, 45, 1070 Bruxelles*

RÉSUMÉ

Sur des extraits de globules blancs de bovins, les auteurs ont observé un polymorphisme de l'adénosine déaminase (ADA). Il comporte dix phénotypes. L'hypothèse de quatre allèles codominants est proposée. Elle est en accord avec les études faites sur 31 paires de jumeaux univitellins, sur la descendance de dix taureaux IA et sur la structure génétique de quatre populations.

INTRODUCTION

L'adénosine déaminase (adénosine aminohydrolase ; ADA ; E. C. 3.5.4.4) catalyse l'hydrolyse de l'adénosine en inosine et en ammoniac. Son rôle essentiel paraît résider dans la régulation de la concentration tissulaire en adénosine. Cette substance se comporte, en effet, comme un vasodilatateur puissant, principalement au niveau des vaisseaux coronaires (DRURY et SZENT-GYÖRGYI, 1929 ; RUBIO *et al.*, 1969).

Cette enzyme est très largement distribuée dans les tissus animaux (CONWAY et COOKE, 1939 ; BRADY et O'DONOVAN, 1965). Certains organes ou tissus apparaissent particulièrement riches : le duodénum, la rate, le poumon du veau (BRADY et

(1) Travail exécuté sous les auspices de l'Institut pour l'encouragement de la Recherche scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I. R. S. I. A.).

O'DONOVAN, 1965), les globules rouges humains (EDWARDS *et al.*, 1971), les leucocytes du lapin (BARNES, 1940), les lymphocytes (HALL, 1963).

La filtration en gel de Séphadex permet de séparer deux classes principales d'adénosine déaminase, d'après leur poids moléculaire : une classe de poids moléculaire élevé (100 000 et 200 000, MA et FISHER, 1968-1969 ; 280 000 et 440 000, EDWARDS *et al.*, 1971) et une classe de poids moléculaire plus faible (30 000 à 52 000, PFROGNER, 1967 ; WOLFENDEN *et al.*, 1968 ; MURPHY *et al.*, 1969 ; SIM et MAGUIRE, 1971 ; EDWARDS *et al.*, 1971).

Cette dernière enzyme est caractérisée, en plus de son poids moléculaire plus faible, par une migration électrophorétique anodale très rapide et par une réactivité spéciale vis-à-vis des agents caractéristiques du groupement SH.

LEE *et al.* (1971), se basant sur l'existence d'une parenté immunochimique évidente, pensent que les formes lourdes ne sont que des agrégats de la même enzyme. Pour RESSLER (1969), AKEDO *et al.*, (1970), les deux formes seraient, sous certaines conditions, interconvertibles.

Chez l'Homme, un polymorphisme génétique a été décrit ; il n'intéresse que la forme légère ou anodique et non les formes plus lourdes. En outre, le spectre électrophorétique des adénosines déaminases varie d'un organe à l'autre. Ces faits ont logiquement amené certains auteurs à postuler l'existence de plusieurs loci (variation cistronique) (EDWARDS *et al.*, 1971).

L'enzyme dénaturée révèle, à la titration par le p-mercuribenzoate, l'existence de deux groupes sulfhydryles (RONCA *et al.* 1967). L'un d'eux, localisé probablement dans une région hydrophobe de la molécule et essentiel pour l'activité enzymatique, possède une faible réactivité.

L'autre groupe, sans doute situé à la surface de la molécule apparaît beaucoup plus accessible à de nombreux réactifs et cela, sans perte du pouvoir enzymatique. D'autre part, l'enzyme est très sensible aux conditions de conservation (par exemple, durée...) : on observe alors, après électrophorèse, le déplacement progressif de l'activité enzymatique vers une zone plus anodique conduisant ainsi à de nombreuses confusions dans l'interprétation du zymogramme. Cette altération de la mobilité résulterait d'une charge négative supplémentaire acquise par le couplage du groupe SH de l'enzyme avec le glutathion oxydé (SPENCER *et al.*, 1968 ; SINHA et HOPKINSON, 1969 ; HOPKINSON et HARRIS, 1969). Le β -mercaptoéthanol restaure la mobilité originelle de l'enzyme.

L'objet de ce travail est de montrer, au niveau des globules blancs de l'espèce bovine, un polymorphisme de l'adénosine déaminase. Le déterminisme génétique de ce polymorphisme est étudié à partir de données relatives à des paires de jumeaux univitellins, à la descendance de plusieurs taureaux d'insémination artificielle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Extraits leucocytaires.

Les leucocytes préparés suivant une méthode déjà décrite (ANSAY *et al.*, 1971) sont homogénéisés à l'aide d'un appareil Ultra-Turrax (TP 18-10 ; JANKE et K. S. KUNKEL) ou ultrasonnés pendant 30 secondes (MSE 150 Watt Ultrasonic desintegrator).

Électrophorèse.

L'électrophorèse en gel d'acrylamide (5 p. 100 ; plaques de 9×12 cm ; épaisseur 1 mm) est pratiquée dans une cuve Shandon modèle U 77. Les insertions (± 10) sont réalisées parallèlement au grand côté cathodique de la plaque, à 1 cm du bord. Avec une tension aux bornes de 400 volts et un refroidissement continu de la plaque d'acrylamide (Cooling Platen, Shandon), l'électrophorèse se déroule pendant 20 à 25 minutes. Le tampon de Shows *et al.*, 1969) a été le plus souvent employé. Immédiatement avant l'électrophorèse, les extraits leucocytaires sont amenés à une concentration de 25 mM en β -mercaptoéthanol.

Révélation.

Après électrophorèse, la plaque d'acrylamide est déposée sur une plaque de verre aux mêmes dimensions (9×12 cm), préalablement recouverte d'un mélange (SPENCER *et al.*, 1968) à base de gélose (1 p. 100) et constitué en concentration finale de :

Tampon phosphate pH 7,2 : 50 mM.

Adénosine : 1,50 mM.

MTT tétrazolium (Sigma) : 0,5 mg/ml.

Phénazine méthosulfate (Sigma) : 0,04 mg/ml.

Nucléoside phosphorylase (Boehringer) : 0,125 UI/10 ml.

Xanthine oxidase (Boehringer) : 0,04 UI/10 ml.

RÉSULTATS

1. — *Action du β -mercaptoéthanol*

Le β -mercaptoéthanol produit une simplification du diagramme électrophorétique. Des phérogrammes composés d'un ensemble de 2 à 6 bandes à différents niveaux sont ramenés à deux types principaux composés soit d'une, soit de deux bandes. Le mercaptoéthanol est efficace à chacun des niveaux du tracé électrophorétique, chacun des phénotypes à une bande paraissant doté du même groupe SH libre (fig. 1).

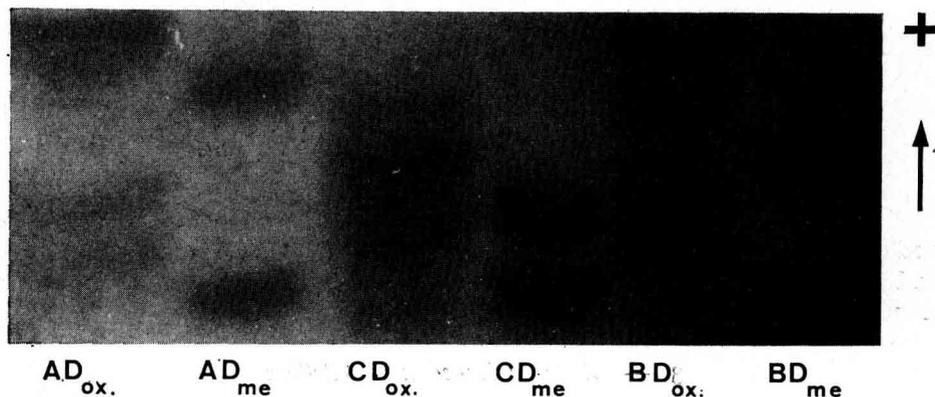


FIG. 1. — Comparaison d'extraits leucocytaires vieillis, avant (oxydés : ox) et après adjonction de β -mercaptoéthanol (me)

2. — Description des phénotypes ADA

L'examen des zymogrammes provenant d'un grand nombre d'animaux a révélé l'existence de 10 types électrophorétiques : quatre à une bande, six à deux bandes (fig. 2). Chaque phénotype à deux bandes représente une combinaison particulière de deux des phénotypes à une bande. D'emblée, se présente à l'esprit, l'hypothèse de quatre allèles autosomaux, codominants, les génotypes homozygotes ayant les phénotypes à une bande, les génotypes hétérozygotes ayant les phénotypes à deux bandes.

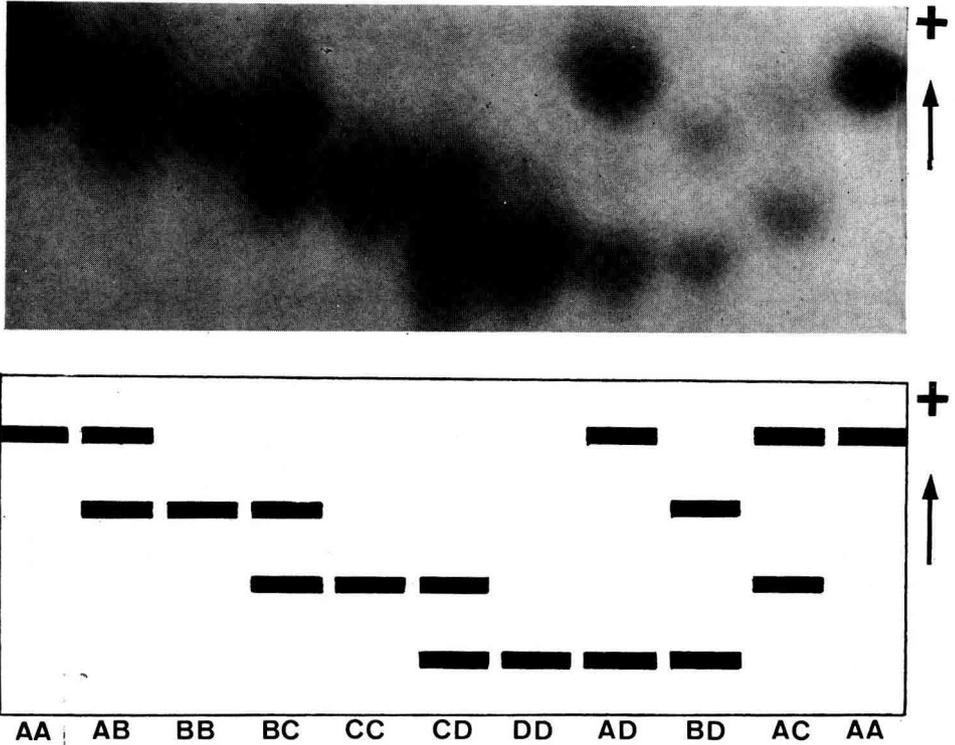


FIG. 2. — Zymogramme en gel d'acrylamide
(5 p. 100 ; tampon de Shows *et al.*, 1969 ; 20 minutes)
d'extraits leucocytaires montrant les 10 phénotypes rencontrés

Suivant l'usage, on peut donner le symbole A à la bande montrant la mobilité anodique la plus grande ; elle est suivie des bandes B, C et D. Les phénotypes à une bande seront, dès lors, AA, BB, CC et DD tandis que les phénotypes à deux bandes seront AB, AC, AD, BC, BD, CD (fig. 2).

3. — Étude de jumeaux univitellins

Le zymogramme de 31 paires de jumeaux monozygotiques appartenant à la firme Merck, Sharp and Dohme a été étudié. La monozygotie probable de ces

jumeaux avait été établie par le *Laboratoire des Groupes Sanguins de Wageningen*. Pour la plupart, ces animaux étaient d'origine hollandaise ou suédoise et représentaient différentes races de ces pays.

La concordance fut parfaite entre jumeaux d'une même paire en ce qui concerne le phénotype ADA. Des 10 phénotypes habituellement répertoriés, 9 ont été observés dans ce matériel (tabl. 1). Cette observation démontre la nature héréditaire des variations individuelles en ce qui concerne le phénotype ADA.

TABLEAU I

Répartition des phénotypes ADA chez 31 paires de jumeaux univitellins

Phénotype	AA	AB	AC	AD	BB	BC	BD	CC	CD	DD
Nombre de paires de jumeaux possédant ce phénotype ...	2	1	2	6	1	7	4	—	5	3

4. — Données génétiques

On ne dispose que rarement de données suffisamment nombreuses qui permettraient d'analyser la ségrégation des allèles pour chacun des quarante-cinq types possibles d'accouplement prévus pour un système à quatre allèles. Aussi, avons-nous été amenés à étudier séparément la ségrégation de chacun des quatre allèles, l'alternative génétique étant représentée par les autres allèles considérés comme n'en faisant qu'un et symbolisés par le signe + (KHATTAB *et al.*, 1964).

La descendance de 10 taureaux d'insémination artificielle a été étudiée : ces derniers représentaient les phénotypes BB (20 descendants), BD (75 descendants), AD (50 descendants), BC (30 descendants), AB (41 descendants).

Les données utiles sont rassemblées dans le tableau 2. Le test statistique du χ^2 a été appliqué dans les cas où les espérances étaient supérieures à cinq. Les probabilités indiquées sont les probabilités d'écarts aussi grands ou plus grands, l'hypothèse nulle étant vraie. Toute probabilité inférieure à 5 p. 100 est marquée d'un astérisque.

L'accord entre les fréquences observées et les fréquences obtenues en vertu de l'hypothèse proposée, est en général très bon.

De certains accouplements, on ne prévoit qu'une seule classe de descendants. Ce sont les accouplements homozygotes \times homozygotes, que ces homozygotes soient semblables ou différents.

La statistique du χ^2 a été calculée pour treize accouplements. Le seuil de probabilité 5 p. 100, impliquant le rejet de l'hypothèse nulle, a été dépassé pour l'accouplement $C+ \times ++$; par contre, il y a accord entre les faits et l'hypothèse pour l'accouplement réciproque, lequel portait sur un nombre plus élevé d'individus. Le seuil de signification est approché pour l'accouplement $++ \times A+$ alors que l'accouplement réciproque $A+ \times ++$ est très éloigné de ce seuil.

Nous retiendrons comme conclusion globale qu'il y a accord entre les faits observés et l'hypothèse proposée.

TABLEAU 2

Analyse statistique des données de ségrégation
(les valeurs prévues sont entre parenthèses)

Phénotypes parentaux Père × Mère	Phénotypes des descendants			Probabilité d'écarts aussi grands ou plus grands (%)
	A-A	A+	++	
A+ × A-A	7 (6)	5 (6)	—	56,37
A+ × A+	8 (7,25)	14 (14,5)	7 (7,25)	94,96
++ × ++	—	31 (28,5)	26 (28,5)	50,78
++ × A-A	—	1	—	
++ × A+	—	29 (22,5)	16 (22,5)	5,26
++ × ++	—	—	79	
	B-B	B+	++	
B-B × B+	1	2	—	
B-B × ++	—	17	—	
B+ × B-B	2	—	—	
B+ × B+	11 (10,75)	21 (21,5)	11 (10,75)	98,84
B+ × ++	—	55 (50,5)	46 (50,5)	37,05
++ × B+	—	4 (5,5)	7 (5,5)	36,57
++ × ++	—	—	39	
	C-C	C+	++	
C+ × C-C	2	—	—	
C+ × C+	2	5	7	
++ × ++	—	3 (7)	11 (7)	3,25*
++ × C-C	—	8	—	
++ × C+	—	39 (41)	43 (41)	65,87
++ × ++	—	—	96	
	D-D	D+	++	
D+ × D-D	9 (7)	5 (7)	—	28,50
D+ × D+	14 (16,5)	34 (33)	18 (16,5)	76,13
++ × ++	—	22 (23)	24 (23)	76,80
++ × D-D	—	11	—	
++ × D+	—	25 (25,5)	26 (25,5)	88,87
++ × ++	—	—	28	

N. B. — La ségrégation de chacun des quatre allèles A, B, C, D est étudiée vis-à-vis des autres allèles considérés comme n'en faisant qu'un et symbolisés par le signe +.

5. — Données de population

Quatre races bovines ont été échantillonnées. Il s'agit, en fait, d'animaux amenés à l'abattoir local. Les races intéressées sont : la race de *moyenne et haute Belgique*, la race *pie-noire (frisonne)*, la race *pie-rouge (M. R. Y.)* et la race *charolaise*.

TABLEAU 3
La distribution de quatre échantillons raciaux dans les dix classes phénotypiques
 (entre parenthèses, les fréquences prévues d'après la loi d'équilibre de Hardy-Weinberg)

Races	Classes phénotypiques										Probabilité d'écart aussi grands ou plus grands (%)
	AA	AB	AC	AD	BB	BC	BD	CC	CD	DD	
<i>Moyenne et Haute-Belgique</i>	25 (23,92)	31 (34,52)	54 (55,73)	95 (91,92)	11 (12,46)	44 (40,22)	69 (66,34)	30 (32,47)	110 (107,10)	84 (88,32)	94,70
<i>Pie-Noire (Frisonne)</i>	4 (5,21)	7 (7,75)	11 (11,22)	13 (9,62)	3 (2,88)	8 (8,34)	8 (7,15)	9 (6,04)	5 (10,36)	5 (4,44)	42,77
<i>Pie-Rouge (M. R. Y.)</i>	8 (8,13)	4 (8,63)	19 (17,27)	25 (21,84)	2 (2,29)	14 (9,17)	12 (11,60)	8 (9,17)	19 (23,21)	15 (14,67)	35,63
<i>Charolaise</i>	3 (1,86)	3 (5,42)	3 (4,74)	10 (8,12)	5 (3,94)	6 (6,89)	13 (11,82)	3 (3,02)	13 (10,34)	6 (8,86)	54,65

La distribution de ces quatre échantillons dans les 10 classes phénotypiques est donnée dans le tableau 3. L'échantillon prélevé dans la race de *moyenne et haute Belgique* compte 553 sujets. L'accord entre les fréquences observées et les fréquences prévues est excellent. Ceci constitue un argument important en faveur de l'hypothèse d'une série de quatre allèles. Le tableau 4 montre les fréquences particulières des quatre

TABLEAU 4

Fréquence des allèles dans les quatre échantillons raciaux

Races	Allèle A	Allèle B	Allèle C	Allèle D	Effectifs
<i>Moy. et Haute Belgique</i>	20,80	15,01	24,23	39,96	553
<i>Pie-Noire (Frisonne)</i>	26,71	19,86	28,77	24,66	73
<i>Pie-Rouge (M.R.Y.)</i>	25,40	13,49	26,98	34,13	126
<i>Charolaise</i>	16,92	24,61	21,54	36,92	65

allèles dans les races échantillonnées. Les fréquences de l'allèle B et de l'allèle D sont significativement différentes entre les races ($\chi^2 = 10,80, 3$ degrés de liberté) pour l'allèle B et ($\chi^2 = 14,38, 3$ degrés de liberté) pour l'allèle D. La fréquence de l'allèle B est significativement plus élevée dans la race *charolaise* que dans les races de *moyenne et haute Belgique* et *pie-rouge* (tabl. 5). La fréquence de l'allèle D est significativement plus faible dans la race *pie-noire* que dans les autres races envisagées (tabl. 5).

TABLEAU 5

Signification des différences entre races, pour les fréquences des allèles B et D (valeurs des χ^2 à un degré de liberté)

	<i>Pie-Noire</i>	<i>Pie-Rouge</i>	<i>Charolaise</i>
Allèle B			
<i>Moyenne et Haute Belgique</i>	2,31	0,38	7,98**
<i>Pie-Noire</i>		2,87	0,90
<i>Pie-Rouge</i>			7,42**
Allèle D			
<i>Moyenne et Haute Belgique</i>	12,80**	2,94	0,45
<i>Pie-Noire</i>		3,90*	4,89*
<i>Pie-Rouge</i>			0,29

* significatif au seuil 5 p. 100 ;

** significatif au seuil 1 p. 100.

DISCUSSION

L'interprétation des zymogrammes de l'adénosine déaminase a été considérablement simplifiée par l'adjonction de β -mercaptoéthanol. A ce point de vue, la similitude de comportement des enzymes de l'Homme et des bovins est évidente. Les effets du vieillissement sur l'enzyme humain peuvent conduire à une confusion totale dans la lecture des zymogrammes (HOPKINSON et HARRIS, 1969).

L'hypothèse génétique de quatre allèles codominants n'exclut pas la révélation de phénotypes nouveaux. On sait, en effet, que l'amélioration constante du pouvoir résolutif des techniques électrophorétiques a souvent conduit à subdiviser les allèles précédemment reconnus (voir, par exemple, le cas des transferrines bovines : JAMIESON, 1965).

La présence de deux bandes seulement, chez l'hétérozygote, est bien compatible avec le fait généralement admis (MURPHY *et al.*, 1969) que l'enzyme ne possède pas de sous-unités.

Chez l'Homme, SPENCER *et al.* (1968) ont décrit dans les globules rouges, l'existence de 3 phénotypes : ADA-1, ADA-2.1, ADA-2, dus à deux allèles relativement communs et déjà largement étudiés (LUCARELLI *et al.*, 1971). D'autres phénotypes très rares ont été identifiés (HOPKINSON *et al.*, 1969 ; DISSING et KNUDSEN, 1969 ; DETTER *et al.*, 1970).

L'image phénotypique de l'adénosine déaminase paraît plus simple chez les bovins (1 ou 2 bandes) que chez l'Homme où elle est compliquée par la présence d'isozymes secondaires. Ce phénomène de simplification pourrait être dû à l'utilisation du gel d'acrylamide ; il avait déjà été noté pour la malate déshydrogénase mitochondriale (ANSAY *et al.*, 1971).

Reçu pour publication en septembre 1972.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas été possible sans la collaboration des docteurs DIMITRIPOULOS, MAGONET, MARCOURT et STEPHANY, directeurs de *Centres d'Insémination artificielle*. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute notre gratitude.

Nous adressons également nos remerciements à la firme Merck, Sharp et Dohme (division vétérinaire) qui nous a permis d'utiliser son troupeau de jumeaux monozygotiques.

Nous remercions aussi F. GROSCLAUDE, du C. N. R. Z., chargé de la lecture du manuscrit, pour ses remarques judicieuses.

SUMMARY

POLYMORPHISM OF THE ADENOSINE DEAMINASE (ADA)
IN THE BOVINE SPECIES

Working on extracts of bovine white cells, a polymorphism of the adenosine deaminase (ADA) has been observed. The authors have numbered ten phenotypes. The hypothesis of four autosomal codominant alleles is in agreement with the observations made on 31 monozygotic twin pairs, on the progeny of ten bulls used in artificial insemination and on the genetic structure of four cattle populations.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKEDO H., NISHIHARA H., SHINKAI K., KOMATSU K., 1970. Adenosine deaminases of two different molecular sizes in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 189-191.
- ANSAY M., HANSET R., ESSER-COULON J., 1971. La malate déshydrogénase mitochondriale : variants électrophorétiques de nature héréditaire dans l'espèce bovine. *Ann. Génét. Sé. anim.*, **3**, 235-243.
- BARNES J. M., 1940. The enzymes of lymphocytes and polynuclear leucocytes. *Brit. J. Exptl Pathol.*, **21**, 264-275.
- BRADY T. G., O'DONOVAN C. I., 1965. A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **44**, 101-120.
- CONWAY E. J., COOKE R., 1939. LIX. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. *Biochem. J.*, **33**, 479-492.
- DETTER J. C., STAMATOYANNOPOULOS G., GIBLETT E. R., MOTULSKY A. G., 1970. Adenosine deaminase : racial distribution and report of a new phenotype. *J. medical Genetics*, **7**, 356-357.
- DISSING J., KNUDSEN J. B., 1969. A new red cell adenosine deaminase phenotype in man. *Human Heredity*, **19**, 375-377.
- DRURY A. N., SZENT-GYÖRGYI A., 1929. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.*, **68**, 213-237.
- EDWARDS Y. H., HOPKINSON D. A., HARRIS H., 1971. Adenosine deaminase isozymes in human tissues. *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **35**, 207-219.
- HALL J. G., 1963. Adenosine deaminase activity in lymphoid cells during antibody production. *Austral. J. exp. Biol.*, **41**, 93-98.
- HOPKINSON D. A., HARRIS H., 1969. The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch gel electrophoresis. Studies on red cell adenosine deaminase. *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **33**, 81-87.
- HOPKINSON D. A., COOK P. J. L., HARRIS H., 1969. Further data on the adenosine deaminase (ADA) polymorphism and a report of a new phenotype. *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **32**, 361-367.
- JAMESON A., 1965. The genetics of transferrins in cattle. *Heredity*, **20**, 419-441.
- KHATTAB A. G. H., WATSON J. H., AXFORD R. F. E., 1964. Association between transferrin polymorphism and disturbed segregation ratios in *welsh mountain* sheep. *Anim. Prod.*, **6**, 207-213.
- LEE P. C., FISHER J. R., MA P. F., 1971. Comparative and immunochemical studies of bovine adenosine deaminase. *Comp. Biochem. Physiol. part B*, **40**, 1071-1079.
- LUCARELLI P., AGOSTINO R., PALMARINO R., BOTTINI E., 1971. Adenosine deaminase polymorphism in Sardinia. *Humangenetik*, **14**, 1-5.
- MA P. F., FISHER J. R., 1968. Two different hepatic adenosine deaminases in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 153-159.
- MA P. F., FISHER J. R., 1969. Comparative studies of mammalian adenosine deaminases. Some distinctive properties in higher mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **31**, 771-781.
- MURPHY P. M., NOONAN M., COLLINS P., TULLY E., BRADY T. G., 1969. Preparative isolation of the isoenzymes of adenosine deaminase from bovine mucosa by ion-exchange chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 157-166.
- PFRIGNER N., 1967. Adenosine deaminase from calf spleen. II. Chemical and enzymological properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 147-154.
- RESSLER N., 1969. Tissue characteristic forms of adenosine deaminase. *Clin. Chim. Acta*, **24**, 247-251.
- RITTER H., WENDT G. G., TARIVERDIAN G., ZILCH J., RUBE M., KIRCHBERG G., 1971. Genetics and linkage analysis of adenosine deaminase. *Humangenetik*, **14**, 69-71.
- RONCA G., BAUER C., ROSSI C. A., 1967. Role of Sulphydryl groups in adenosine deaminase. *European J. Biochem.*, **1**, 434-438.
- RUBIO R., BERNE R. M., KATORI M., 1969. Release of adenosine in reactive hyperemia of the dog heart. *Amer. J. Physiol.*, **216**, 56-62.
- SHOWS T. B., RUDDLE F. H., RODERICK T. H., 1969. Phosphoglucomutase electrophoretic variants in the mouse. *Biochem. Genet.*, **3**, 25-36.
- SIM M. K., MAGUIRE M. H., 1971. Studies on adenosine deaminase. I. Purification and some properties of bovine placental adenosine deaminase. *Eur. J. Biochem.*, **23**, 17-21.
- SINHA K. P., HOPKINSON D. A., 1969. The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch gel electrophoresis. Studies on the human red cell peptidase variant Pep A 5-1. *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **33**, 139-148.
- SPENCER N., HOPKINSON D. A., HARRIS H., 1968. Adenosine deaminase polymorphism in man. *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **32**, 9-14.
- WOLFENDEN R., TOMOZAWA Y., BAMMAN B., 1968. Takadiastase adenosine deaminase, calf duodenal adenosine deaminase and rabbit muscle adenosine monophosphate deaminase. A comparison of physical properties and amino acid composition. *Biochemistry*, **7**, 3965-3969.